

木村 建

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

研究テーマ

16-2-19：ほ乳類の卵胞培養系の開発

ABSTRACT

To develop a reliable preantral follicle culture system, rat preantral follicles were mechanically isolated from the ovaries of 3-week-old Wister rats and cultured individually in droplets, on floating membrane, or in collagen gel for 8 days with McCoys' 5A medium containing FSH, and ovulated with hCG. There was no significant difference among the three culture systems in the growth rate of the oocyte diameters. However, follicles cultured in collagen gel system maintained good morphological characters of cumulus-oocyte-complex throughout the period. The survival rate of preantral follicle was doubled in the collagen gel system(67%) than in the droplet system(30%).

研究目的

未発育の卵胞をほ乳類の卵巣から取り出し、体外で培養して発育させ、産仔を得る試みが家畜を中心に行われている。優良家畜の育種や増産に有効な方法であるとともに、治療上やむなく摘出し、凍結保存しておいた卵巣由来の卵胞を用いた妊娠・出産を可能にする医療技術にもつながる技術であるために、その方法の確立が期待されている。しかし、この方法で産仔を得られたのは現在のところマウスに限定されている。

マウス以外のほ乳種類でも、体外受精、体外発生、借り腹への移植による出産の技術は完成しているが、未発育な卵胞を体外で発育させ、成熟させる有効な方法は、数多くの研究によっても実現できていない。この研究は、ウシとラットを用いて、卵巣から摘出した前胞状卵胞の体外培養系を確立することを目的に行った。

5年間の研究内容と成果

ウイスター系ラットの5週齢の雌から摘出した卵巣を、0.3% PVP、0.01% BSA、4mM ヒポキサンチンを含む McCoy's 5A 培養液中で細切した後、180 μm のステンレスメッシュ上ですりつぶし、培養液に懸濁させた。懸濁液を遠心洗浄した後、少量の培養液に再懸濁し、実体顕微鏡下で前胞状卵胞を採取した。採集後、倒立顕微鏡を用いて、卵母細胞の直径を測定し、35 μm 以上、45 μm 以下の前胞状卵胞を選んで培養実験に用いた。

培養は以下の3通りの方法を用いて行った。

- (A) 静置培養：96 穴マイクロプレートの穴に1個の卵胞を入れて200 μL の培養液中で培養
- (B) 器官培養：24 穴のマイクロプレートの穴に、ステンレス製金網を用いて高さ2 mm の足場を作り、600 μL の培養液を添加し、金網に載せたメンブレンフィルター上で卵胞を培養
- (C) ゲル包埋培養：0.5 mm メッシュのナイロン製網の網目に Type I コラーゲンを用いて0.4%濃度のゲルを作成し、1個の卵胞を包埋して(B) で用いたステンレス製足場の上にナイロンメッシュを載せ、600 μL の培養液を添加して培養

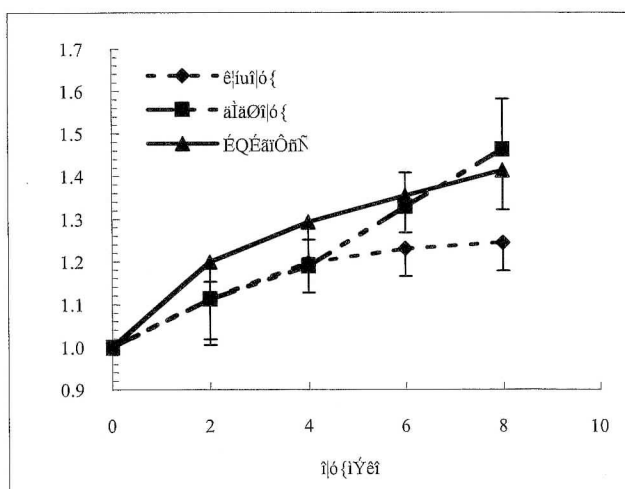


図 1 培養期間中の卵母細胞の直径増加率

培養液には 100 mIU/mL の FSH、0.1% BSA、4mM ヒポキサンチン、1 mM の ITS を添加した McCoy's 5A 培養液 (pH=7.3) を用い、37°C、5%炭酸ガスの湿潤気相下で 8 日間培養した。培養期間中は 1 日置きに培養液の半量を新しいものと交換した。同時に顕微鏡観察を行い、卵胞と卵母細胞の直径を測定した。

培養期間中の卵母細胞の直径の変化を図 1 に示した。一般的に用いられている培養方法である静置培養 (A) では、卵母細胞の直径の増加が培養 6 日目で止まってしまうが、卵胞を培養液に浮かせて気相に近づけて培養を行った (B) と (C) では、増加が続いた。卵母細胞の直径増加で判断すると、長期間の培養には卵胞を気相

に近づけて培養する (B) または (C) が優れており、増加率の高い (B) がより優れていると思われる。しかし、(B) の培養後期には、卵胞と卵母細胞が培養液の表面張力の影響を受けて扁平となることが観察され、直径の増加には、押しつぶされることによる増加が加算されていることが推測された。コラーゲンゲルで包埋した (C) では、卵巣からの分離直後の像 (図 2) と比較して、培養後の卵胞 (図 3) の形状が大きく変化しないことから、直径の増加が扁平化による物ではないことが確認できた。

8 日間の培養期間中で卵胞の生存率は、静置培養で 30%、器官培養で 58%、ゲル包埋で 67%と、ゲル包埋法が最も高かった。培養の最終日に、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を 5 IU/mL の濃度になるように添加した培地に移し排卵誘導を行ったが、いずれの培養群でも排卵を観察できなかった。

以上の結果から、前胞状卵胞の体外培養系として、コラーゲンゲルに包埋し、気相近くに浮遊させて培養させる方法が有効であるものと推察された。今後は、コラーゲンゲル包埋・浮遊法を用いて、より長期間の培養実験を行い、前胞状卵胞の体外培養系を確立する予定である。

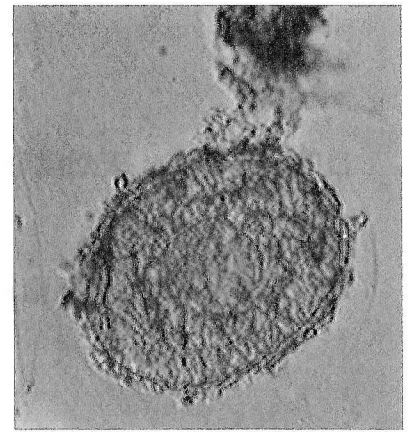


図 2 分離直後の前胞状卵胞



図 3 ゲル中で 8 日間培養後の卵胞